



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 N.º de publicación: **ES 2 079 319**

②1 Número de solicitud: 9401056

⑤1 Int. Cl.⁶: C12Q 1/10

①2

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②2 Fecha de presentación: **16.05.94**

④3 Fecha de publicación de la solicitud: **01.01.96**

④3 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.01.96

⑦1 Solicitante/s: **José María García Aguayo**
C/ Conde Valledano, 39
46340 Requena, Valencia, ES

⑦2 Inventor/es: **García Aguayo, José María**

⑦4 Agente: **Cañadell Isern, Roberto**

⑤4 Título: **Medio de cultivo bacteriológico y procedimiento para su preparación.**

⑤7 Resumen:

Medio de cultivo bacteriológico y procedimiento para su preparación.

Consiste en la asociación de peptona-proteosa, extractos de carne y levaduras, xilosa, X-GAL, IPTG, sales biliares, novobiocina, rojo neutro y agar agar en solución de agua desionizada, para su conservación en frigorífico y utilización antes de 30 días a contar de la fecha de su preparación.

La preparación comprende el hervido del X-GAL en agua desionizada, la adición de peptona, xilosa, sales biliares, y extractos de carne y levaduras, completando la disolución con la adición de nueva agua desionizada, rojo neutro al 0,1 por ciento, agar agar y, finalmente, soluciones acuosas estériles de novobiocina e IPTG, disponiendo el producto en placas Petri sobre las que se deja enfriar hasta su total solidificación.

Aplicable al aislamiento e identificación de bacterias enteropatógenas, principalmente Salmonella, Shigella y Aeromonas.

ES 2 079 319 A1

DESCRIPCION

La presente patente de invención se refiere a un medio de cultivo bacteriológico y a un procedimiento para su preparación.

El nuevo medio de cultivo se destina al aislamiento primario, o tras enriquecimiento selectivo, de bacterias enteropatógenas pertenecientes a los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Aeromonas*, *Yersinia*, *Plesiomonas* y *Vibrio*, habiéndose demostrado eficaz en medicina clínica para el diagnóstico de infecciones intestinales producidas por los tres primeros.

El medio se caracteriza por el gran poder nutritivo para estas bacterias y por la sensibilidad y especificidad de sus identificadores bioquímicos, así como por su moderado, efecto selectivo sobre otras bacterias sin interés (flora acompañante), que pueden estar presentes en las muestras a estudio y cuyo desarrollo repercute negativamente en el cultivo de las patógenas.

Por todo ello, su campo de aplicaciones se extiende, además, a otras áreas, como la Salud Pública, la Veterinaria y la Industria, particularmente de alimentos y bebidas, donde estos microorganismos tienen gran importancia.

El estado de la técnica para el cultivo de *Salmonella*, *Shigella* y *Aeromonas* revela una gran variedad de medios, cuyo efecto selectivo sobre la flora acompañante condiciona, por otra parte, la diversidad de especies patógenas que se puede cultivar. En general, los más selectivos tienen un excelente efecto supresor de dicha flora, pero cultivan exclusivamente *Salmonella*, mientras que los menos selectivos se muestran ineficaces, en muchas circunstancias, para frenar el desarrollo de la flora, aunque en condiciones óptimas sean capaces de cultivar otros patógenos, además de *Salmonella*.

Existe un rango de selectividad intermedio en el que se encuentra la mayor variedad de medios, pero la mayoría de los mismos incluye en su composición unos identificadores bacterianos que adolecen de la suficiente sensibilidad para detectar más de dos especies patógenas distintas, así como de la especificidad necesaria para reducir al mínimo la confusión de dichas especies con otras que no lo son. Ejemplos muy conocidos son el Hektoen, el Xilosa-Lisina-Desoxicolato, el Desoxicolato-Citrato de Leifson y todas sus modificaciones, el *Salmonella-Shigella*, el Rambach, el Mc Conkey, etc.

El nuevo medio de cultivo ha sido comparado con tres de los anteriores y los resultados, en términos generales, han mostrado la superioridad de éste por lo que se refiere a la menor cantidad de positivos falsos, siendo similar la de patógenos aislados, cuando no mayor. Esto supone la realización de menor cantidad de pruebas para la confirmación de los aislamientos sospechosos y, por tanto, más economía de tiempo y medios técnicos en la investigación de bacterias enteropatógenas.

La composición cualitativa y cuantitativa del nuevo medio, que podríamos denominar XG (por "X" ilosa y "G" alactosidasa), se detalla en la tabla adjunta en gramos por litro. Como puede verse, contiene una base nutritiva muy rica compuesta por la peptona-proteosa y los extractos

de carne y levaduras, cuya aportación, además, al correcto funcionamiento de los identificadores bacterianos, como son la xilosa y el X-GAL, es imprescindible. Su moderada selectividad, por otra parte, radica en la presencia de la mezcla normalizada de sales biliares, que inhibe el desarrollo de grampositivos, y de la novobiocina, que repercute sobre *Proteus* y refuerza el efecto de las sales biliares.

Según la respuesta de las diferentes especies bacterianas a los identificadores referidos, el medio XG distingue cuatro patrones básicos de colonias:

1°. Rojas, propias de *Salmonella*, incluso la especie tífica.

2°. Verdes, demostrativos de *Aeromonas*, *Plesiomonas* y de la especie *Shigella sonnei*. También algunas cepas de *Yersinia enterocolitica* que no fermentan xilosa.

3°. Incoloras, características de *Vibrio* y de otras especies de *Shigella*. Así mismo, cepas de *Yersinia enterocolitica* que no fermentan xilosa.

4°. Malvas, identificadoras de la flora no patógena.

La preparación del medio de cultivo objeto de la presente patente de invención se realiza según el siguiente procedimiento:

1°. Se hierven 0,1 g de X-GAL en 100 ml de agua desionizada, aproximadamente, hasta su total disolución.

2°. La disolución se vierte en un matraz aforado de 1000 ml y se le añade 500 ml de agua desionizada templada.

3°. Se disuelven los componentes siguientes, mediante adición y agitación suave, por este orden: peptona-proteosa, xilosa, sales biliares, extracto de carne y extracto de levaduras.

4°. Se añade 30 ml de una solución acuosa, previamente preparada, de rojo neutro al 0,1% y se enrasa a 1000 ml, con agua desionizada.

5°. La solución resultante se vierte en un matraz tipo Erlenmeyer, se añade el agar agar y se hierve por aplicación suave y progresiva de calor hasta alcanzar una total transparencia, evitando el sobrecalentamiento.

6°. El producto no debe autoclavarse, y una vez se ha enfriado hasta 50°C, se añaden 5 ml de solución acuosa estéril de novobiocina 1,4 mM y 1 ml de solución acuosa estéril de IPTG 10 mM.

7°. Se dispensa en placas de 90 mm, a razón de unos 20 ml por placa, y se deja enfriar hasta su total solidificación.

El producto debe conservarse en frigorífico, hasta su utilización, la cual no debe producirse más allá de un mes a contar de la fecha de su preparación.

Tabla: Composición del medio XG

Componentes	gramos/1000 ml
D(+)-Xilosa	15
X-GAL(*)	0,1
IPTG (**)	2,4.10 ⁻³
Peptona-Proteosa	10
Extracto de carne	3
Extracto de levaduras	3

Sales biliares	5
Rojo neutro	30.10 ⁻³
Novobiocina	5.10 ⁻³
Agar-agar	15
Agua desionizada	1000

(*) 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galacto-pirano-sido.

(**) Isopropil β -D-tiogalactopirano-sido.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Medio de cultivo bacteriológico y procedimiento para su preparación, **caracterizado** esencialmente por comprender la asociación de la D(+)-xilosa, a razón de 15 g/1000 ml, del X-GAL o 5-bromo-4-cloro-3-indolil beta-D-galactopiranosido, a razón de 0,1 g/1000 ml, del IPTG o isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido, a razón de 2,4.10-3 g/1000 ml, de la peptona-proteosa, a razón de 10 g/1000 ml, de extracto de carne a razón de 3 g/1000 ml, de extracto de levaduras a razón de 3 g/1000 ml, de sales biliares a razón de 5 g/1000 ml, de rojo neutro a razón de 30.10-3 g/1000 ml de novobiocina a razón de 5.10-3 g/1000 ml, de agar agar a razón de 15 g/1000 ml y de agua desionizada en un volumen de 1000 ml.

2. Medio de cultivo bacteriológico y procedimiento para su preparación, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el proceso para la fabricación del medio de cultivo comprende las operaciones siguientes:

- a) hervir el X-GAL en proporción de 0,1 gr en 100 ml de agua desionizada, hasta su total disolución;
- b) verter la solución en un matraz aforado de 1000 mml, con adición de 500 ml de

agua templada y disolución de los siguientes componentes, mediante adición y agitación suave por este orden: peptona, xilosa, sales biliares, extracto de carne y extracto de levaduras;

- c) adición de 30 ml de una disolución acuosa, previamente preparada, de rojo neutro al 0,1%;
- d) enrasar a 1000 ml con agua desionizada y verter la solución resultante en un matraz, con adición del agar agar;
- e) hervir con aplicación suave y progresiva de calor hasta alcanzar una total transparencia, evitando un sobrecalentamiento innecesario;
- f) dejar enfriar hasta 50°C y agregar 5 ml de una disolución acuosa estéril de novobiocina 1,4 mM y 1 ml de una solución acuosa estéril de IPTG 10 mM;
- g) disponer el producto en placas de 90 mm a razón de 20 ml por placa, dejando enfriar hasta su total solidificación en orden a su utilización antes de un mes a contar de la fecha de preparación, y conservación en frigorífico durante dicho período.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

⑪ ES 2 079 319

⑫ N.º solicitud: 9401056

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 16.05.94

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C12Q 1/10

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US-3893889-A (WARREN B. et al.) 08.07.75	
A	US-3870601 (WARREN B. et al.) 11.03.75	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe 17.05.95	Examinador J. López Nieto	Página 1/1
--	------------------------------	---------------

THIS PAGE BLANK (USPTO)